

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-265498

(43) 公開日 平成10年(1998)10月6日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47
A 6 1 K 38/00	AAA	1/18
C 0 7 K 1/18		1/20
1/20		1/34
1/34		C 1 2 P 21/02
		C

審査請求 未請求 請求項の数7 F D (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-90305

(22) 出願日 平成9年(1997)3月24日

(71) 出願人 000228545

日本ケミカルリサーチ株式会社
兵庫県芦屋市春日町3番19号

(72) 発明者 亀井 正一郎

神戸市垂水区桃山台1-6 J C R C O
U R T 415

(72) 発明者 桐原 清

三木市志染町青山5-19-19

(72) 発明者 西中 理恵

神戸市西区伊川谷町潤和1797-1

(72) 発明者 城野 浩之

神戸市垂水区小東山3-3-7

(74) 代理人 弁理士 竹内 卓

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト尿由来の神経グリア細胞増殖因子とその製造法

(57) 【要約】

【目的】 ヒト尿に存在する新規なグリア細胞増殖因子とその製造法を提供すること。

【構成】 ヒト尿から限外ろ過、硫酸による塩析、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーにより精製することができ、SDS-PAGEによる分子量が約29kDaである神経グリア細胞増殖因子。

【効果】 本発明のグリア細胞増殖因子はグリア細胞を増殖させる作用のほか同細胞のNGF因子分泌を促進させ、また神経細胞のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性を増殖させる作用を示し、種々の神経系疾患の治療への用途が期待され、また同因子を遺伝子工学の手法によって製造する途が開かれる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト尿から限外ろ過、硫酸による塩析、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーにより精製することができ、SDS-PAGEによる分子量が約29kDaである神経グリア細胞増殖因子。

【請求項2】 N-末端のアミノ酸配列が

【図6】である請求項1記載の増殖因子。

【請求項3】 N末端のアミノ酸配列が

【図7】である請求項1記載の増殖因子。

【請求項4】 請求項1の増殖因子よりなるグリア細胞の神経成長因子の分泌促進剤。

【請求項5】 請求項1の増殖因子よりなる神経細胞のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性の増強剤。

【請求項6】 請求項2に記載のアミノ酸配列をコードするデオキシリボヌクレオチド配列を含有する神経グリア細胞増殖因子のデオキシリボヌクレオチド。

【請求項7】 請求項3に記載のアミノ酸配列をコードするデオキシリボヌクレオチド配列を含有する神経グリア細胞増殖因子のデオキシリボヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は神経細胞の一部であるグリア細胞の新規な増殖因子に関し、この因子は種々の神経系疾患の治療に応用されうるものである。

【0002】

【従来の技術と発明が解決しようとする課題】神経系は神経細胞（ニューロン）とグリア細胞から構成され、その神経細胞は細胞本体と他の神経細胞に情報を伝える突起細胞からなり、突起の接着部（シナプス）を通じて神経情報が次の神経細胞に伝えられる。グリア細胞の役割は、一般に神経細胞への栄養供給として知られ、オートクリン及びパラクリンに神経栄養因子を分泌して、神経細胞の分化、成長、生存維持を調節している。中枢神経系のグリア細胞種としてはアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア細胞があり、また末梢神経系にはシュワン細胞などが存在している。

【0003】神経系に於いて、神経細胞は出生後に増殖を止めるが、グリア細胞は絶えず分化、増殖、成長を繰り返すことを特徴としている。グリア細胞種であるシュワン細胞は末梢神経の神経軸索の周囲にミエリン鞘を形成して神経細胞を支持し、このようなミエリン鞘の弱体化は、即ちシュワン細胞の損傷や成長不全は、末梢神経系の疾患に深く関連していると推察されている。

【0004】神経細胞系の発達、恒常性の維持や機能は宿主の神経栄養因子に媒介される細胞間の相互作用により調節されている〔T. Ebendal, et al., Journal of Neuroscience Research 40, 276-284, 1995〕。それらの神経栄養因子としてNGF、脳由来神経

栄養因子としてBDNF、ニューロトロフィンとしてNT-3、NT-4、グリア細胞由来の神経発育因子も報告され、またシュワン細胞由来神経発育因子などが知られている。

【0005】現在の医療で治療困難とされている、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮側索硬化症などの各種の神経疾患の細胞レベルでの特徴は、神経細胞の顕著な脱落・消失であることが確認されている。このような理由で、神経細胞の生存維持が病状の軽減やその進行を遅延させると推察される。脳神経系の細胞の死滅を防ぐには、これらの細胞の賦活化が効果的であり、特に細胞数で神経細胞の約10倍を占めて増殖・分化能力を有するグリア細胞を賦活化することが出来れば神経細胞の賦活、生存維持が神経疾患の重要な改善方策になると期待されるが、未だグリア細胞を賦活し、維持する有効な手段は知られていない。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、これまでにラット胚・脳中間野神経細胞を用いた生物活性スクリーニング系を確立し、これを用いてヒト生体由来の画分中の神経栄養活性の存在について検索した。その結果、ヒト尿画分に神経細胞のコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）活性を増加させる物質を見だし、単離、精製を行った。

【0007】すなわち、本発明者らは、ラット胚・脳中間野神経細胞の初代培養系を用い、尿・血液などの生体画分の神経栄養活性について探索した結果、ヒト尿HPA25樹脂非吸着画分に神経細胞のChAT活性を増加させる活性が存在することを発見し、その活性因子の単離・精製することに成功した。具体的には、尿を限外ろ過膜（M. W, 50,000 cut off）でろ過し、そのろ過液を2.2-2.9Mの硫酸アンモニウムで塩析し、沈澱物を溶解してSuperdex-200を用いるゲルろ過クロマトグラフィーで処理した（図1）。ChAT活性画分を集めて、アニオン交換クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーで精製し、凍結乾燥処理して活性なグリア細胞増殖因子を得た。精製した活性因子はSDS-PAGEで分子量約29kDa付近にブロードなバンドを示し（図3）、逆相液体クロマトグラフィーで一つのピークを示した（図2）。SDS-PAGEにおいて幅広いバンドを示すために、活性因子の蛋白質に糖鎖が結合していると推察される。バンドは、β-メルカプトエタノールの有無にかかわらず、分子量の位置に変化は見られず、したがって単量体のポリペプチドから構成されていることを示した（図3）。

【0008】ヒト尿より本発明の細胞増殖因子を単離・精製するには、公知の分離精製方法を適切に組み合わせを行うことができる。塩析や沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子

量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動などの電荷の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法などが挙げられる。このような操作で、効率よく該蛋白質の濃縮、精製を行うことが可能である。

【0009】本活性因子のN-末端アミノ酸配列の39残基の配列が決定された(図6、図7)。この配列についてSwiss-Plotアミノ酸配列データベースとのホモロジー検索で、新規な蛋白質であることが判明した。N-末端のアミノ酸について二種類のセリンとチロシンが認められ、二番目のアミノ酸残基以下が1種類のアミノ酸配列が認められるために、2種類の変異体が存在すると考えられる。

【0010】本発明の活性化因子をラット胚・脳中隔野神経細胞の初代培養系に添加すると(最終濃度0.001 O. D. unit/ml)、神経細胞のChAT活性を増加し、グリア細胞の増殖を示した(図4

(a))。本活性因子とDNA合成阻害剤のシトシンアラビノシド[Cytosine arabinoside (Ara C)]を同時に添加すると増殖は抑制された(図4(b))。培養に無血清培地 Neurobasal (商標、Gibco BRL)を用いるため、本来の細胞の増殖は抑制される(図4(c)) [G. J. Drew et al, J. Neurosci. Res., 35:567 (1993)]。また、神経細胞とグリア細胞の初代培養細胞を血清除去の培地で本活性因子の添加の有無の条件で培養し、培養5日間で顕著な細胞増加数をMTT法により確認した(図5)。本活性因子添加の条件下では、経時的に細胞数の増加が認められ、その無添加の条件では細胞数に殆ど変化が検出されない。

【0011】本活性因子を他の細胞種、例えば神経芽細胞腫のGlo細胞に、無血清培地で添加しても細胞増殖は示されず、本活性因子が細胞種特異性をもつことを示した。グリア細胞が増殖していることを確認する方法として、細胞の免疫染色を行った。グリア細胞のアストロサイトに極在する蛋白質[Glial fibrillary acidic protein (GFAP)]に対し、酵素 β -galactosidaseを結合した抗GFAP抗体を反応染色させることによりアストロサイトを確認できる。増殖細胞をこの抗体で処理すると、増殖した細胞の約半分が染色された。増殖した細胞の半分がアストロサイトで、抗GFAP抗体で染色しない細胞は、その形態よりO-2A幹細胞(アストロサイト-タイプIIとオリゴデンドロサイトの幹細胞)であることを示した(実施例3)。

【0012】本活性因子を神経培養に添加し、神経細胞のChAT活性の培養日数に従う変化を測定した(図

8)。本活性化因子を添加することにより、培養6日目以降著しくChAT活性の増加を示した。本活性化因子とDNA合成阻害剤のAra Cを加えると、グリア細胞の増殖と神経細胞のChATの増加が抑制された。Ara Cのみの添加の場合と活性因子の無添加の場合では、ChAT活性に変化が無く、これらの結果はAra C自体が神経細胞のChAT活性を抑制しないことを示している。この様にグリア細胞の増殖と神経細胞のChAT活性の増加に正の相関関係があり、グリア細胞の増殖により、グリア細胞由来の神経栄養因子量が増大していると推察された。

【0013】これまでにグリア細胞由来の神経栄養因子として神経成長因子(NGF)、Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)等が知られている。そこで、NGFに対する中和抗体を本活性因子とともに加えてChAT活性を比較すると、神経細胞のChAT活性の増加は顕著に抑制された(図9)。このとき、グリア細胞の増殖の抑制は認められない。NGF抗体(1 μ g/ml)添加で本活性因子のChATに対する効果は抑制され、NGF抗体のみではChAT活性に変化はみられず、神経細胞のChAT活性の増加が、グリア細胞の増殖に伴ったグリア細胞由来のNGFの増加に原因することを示している。

【0014】本活性因子は、神経栄養活性を指標に精製したが、栄養活性は常にグリア細胞の増殖とともに示された。DNA合成阻害剤の同時添加によりグリア細胞の増殖を抑制した場合、神経細胞のChAT活性の増加は見られず、本活性因子は神経細胞に間接的に作用していると考えられる。従って、本活性因子の添加によるChAT活性の増加は、本因子によるグリア細胞の増殖促進に伴いグリア細胞由来の栄養因子の増加により促進された結果である。

【0015】本発明は本活性因子のN-末端側アミノ酸配列を含有するグリア細胞増殖因子を含み、また、本活性因子のN-末端側アミノ酸配列をコードするデオキシリボヌクレオチド配列を含有するグリア細胞増殖因子のデオキシリボヌクレオチド配列を含む。さらに、グリア細胞増殖因子のcDNAを得ることで、大腸菌や酵母などの微生物、哺乳動物の細胞を利用して遺伝子工学的に生産が容易に可能である。グリア細胞増殖因子のcDNAに人為的にアミノ酸の欠損、置換、附加などの操作により実質的にその生物活性を維持したグリア細胞増殖因子の誘導体を製造可能である。

【0016】神経系細胞由来の蛋白質・ペプチドである神経栄養因子はこれまでに数種類見だされているが、これらの栄養因子の血流から脳への投与は脳関門で阻止されるために、困難と見なされている。本発明の活性化因子は、尿由来であり、組織への直接投与だけでなく血管投与などの全身的な投与法の可能性を示唆し、脳神経

及び抹消神経の種々の疾患の治療薬になると期待される。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明の活性因子は、たとえば、ヒト尿をキトサンや陰イオン交換樹脂のような吸着剤への吸着、溶出により予備処理したのち限外ろ過し、ろ液を硫酸アンモニウムで塩析し、沈澱を緩衝液に溶解してゲルろ過してChAT活性画分を集め、陰イオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーによって精製物として得ることができる。

【0018】

【実施例】以下に実施例の形で本発明をさらに具体的に説明する。

【0019】実施例1 活性因子の精製

材料

ヒト尿、硫酸アンモニウム（日産化学または和光純薬）、リン酸二水素ナトリウム二水和物（ナカライテスク）、塩化ナトリウム（和光純薬）、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA-2Na）（同仁化学）、フッ化フェニルメチルスルフォニル（ナカライテスク）、PBS（-）（日本製薬）、トリフルオロ酢酸（ナカライテスク）、高速液体クロマトグラフィー用アセトニトリル（和光純薬）、C18逆相HPLC column 218TP54（Vydac）、Hitrap-Q [Q-Sepharose（Pharmacia）]、Superdex 200pg（Pharmacia）。

【0020】操作

濃縮したヒト尿を、キトサンに吸着、溶出した後に、60%飽和濃度の硫酸アンモニウムで硫酸分画し、0.1M NaClを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）で平衡化したHPA25陰イオン交換樹脂に通した。樹脂への非吸着画分1Lを分画分子量50,000のOMEGA CELL（FILTRON）を用いて限外ろ過した。ろ液に最終濃度2.2M（約55%飽和）になるように硫酸アンモニウムを加え、30分穏やかに攪拌した。攪拌後、5,000xgで1時間遠心し、その上清を回収した。上清に最終濃度2.9M（約74%飽和）になるように硫酸アンモニウムを加え、再度30分間穏やかに攪拌し、5,000xgで1時間遠心して沈澱を回収した。沈澱物を10-15mlのPBS（-）に溶解した後に、PBS（-）で平衡化したHi Load 26/60 Superdex 200pg（Pharmacia）で流速2ml/minでゲルろ過した。ChAT活性画分は、0.75 C.V.（column volume）-0.94 C.V.に溶出した（図1）。その活性画分を等量の1mM EDTAを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）と混合し、75mM NaCl、1mM EDTAを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.

0）で平衡化したHi-Trap Q 5ml（Pharmacia）に吸着させた。NaCl濃度を130mMとした溶液でカラムを洗浄した後に、NaCl濃度を160mMとした溶液で活性成分を溶出した。

【0021】活性画分をさらに逆相高速液体クロマトグラフィー（逆相HPLC）により精製した。カラムはC18 Vydac 218TP54（Vydac）を用い、溶媒に0.1%トリフルオロ酢酸を含むMilli-Q 水-アセトニトリル系を用いた。流速は1ml/minとし、溶出物の検出は波長214nmにおける吸光度で測定した。活性は53-54%アセトニトリル溶出画分に示される（図2上部）。画分を回収し、凍結乾燥した後に再度逆相HPLCで精製した。最終的に逆相HPLCにおいて一本のピークのみを示す活性画分が得られた（図2下部）。以上の精製操作を室温で行った。上記の逆相HPLCの詳細を次に記す。

【0022】逆相HPLC（図2）

材料

トリフルオロ酢酸（ナカライテスク）、高速液体クロマトグラフィー用アセトニトリル（和光純薬）、C18逆相HPLC column 218TP54（Vydac）。

操作

溶媒に0.1%トリフルオロ酢酸を含むMilli-Q 水-アセトニトリル系を用い、流速を1ml/minとした。0.1%トリフルオロ酢酸、5%アセトニトリルを含むMilli-Q 水で平衡化したC18逆相HPLC column 218TP54で、0.1%トリフルオロ酢酸を含むMilli-Q 水に溶解した活性因子を移動分離した。図2の破線で示す様に、5-70%のアセトニトリルの濃度勾配で溶出し、溶出物を波長214nmで検出して、本活性因子のシャープなピークを認めた。

【0023】実施例2 SDS-PAGE（図3）

材料

酢酸（和光純薬）、メタノール（和光純薬）、濃度勾配15-25%ポリアクリルアミドゲル「マルチゲル15/25」（第一化学薬品）、クマーシーブリリアントブルー（CBB）（Bio-Rad）、銀染色試薬「第一」（第一化学薬品）、分子量マーカー（Bio-Rad）。

操作

逆相HPLCによって精製した活性因子をトリス-SDS溶液に溶解後に、90℃、2分間の熱処理を行い、これをSDS-PAGE用の試料とした。試料を濃度勾配15-25%のポリアクリルアミドゲル上で、40mAの定電流下、泳動した。泳動後にゲルをCBB染色及び銀染色した。CBB染色では、0.25% CBB（W/V）を含むメタノール：酢酸：Milli-Q 水（9：2：9）の混合液に浸し染色後、メタノール：酢

酸:Milli-Q水(15:10:75)混合液で脱色した。銀染色は、第一化学薬品社の銀染色試薬を用い、添付の手順書に従って染色した。分子量約29kDa付近にブロードな蛋白質バンドが認められ、 β -メルカプトエタノールによる還元及び非還元条件下で蛋白質バンドに変化が見られず、本活性化因子は単量体のポリペプチドであることを示した。

【0024】実施例3

グリア細胞増殖因子のN-末端側のアミノ酸配列の決定 逆相HPLCで精製した本活性化因子を凍結乾燥した後に0.1%トリフルオロ酢酸を含むMilli-Q水に溶解してN-末端アミノ酸配列決定用の試料とした。N-末端アミノ酸配列の決定は、気相シーケンサーモデル476A(PERKIN ELMER)を用いた。アミノ酸配列のホモロジー検索にインターネットを通じた検索プログラムBLST及びDNASISを用いた。N-末端がチロシンとセリンの二種のポリペプチドが見いだされた。

【0025】

【図6】

【図7】

【0026】実施例4 ラット胚・脳中隔野神経細胞の初代培養

材料

胎生17日目ラット胚、L-15 medium(Gibco BRL)、Neurobasal medium(Gibco BRL)、PBS(-)(ニッスイ)、B-27 supplement(Gibco BRL)、L-グルタミン(Gibco BRL)、ゲンタマイシン(Sigma)、ウマ血清(Gibco BRL)、パパイン(和光純薬)、DL-システインHCl(Sigma)、ウシ血清アルブミン(Sigma)、グルコース(Gibco)、エーテル(和光純薬)、ナイロンメッシュ(CELL STRAINER 100um mesh:Falcon)、ポリ-L-リジンコート プレート(セルタイトPLプレート:住友ベークライト)、シトシンアラビノシド(Sigma)。

【0027】操作

妊娠17日目のラットをエーテルにより麻酔後、腹部を切開して胎児の入っている子宮を摘出した。子宮よりラット胚を取り出し、その胚から脳・中隔野を摘出した。中隔野を細胞分散用酵素液(90units Papain、0.01% DNase IをDL-システインHCl 2mg、ウシ血清アルブミン2mg、グルコース50mgを含むPBS(-)10mlに溶解した液に浸し、37℃、15分間処理後に、ウマ血清で酵素反応を止め、ピペッティング操作により細胞を分散した。10分間室温で静置後、100um meshのナイロンメッシュ(CELL STRAINER:Falco

n)でろ過して細胞塊や破碎した細胞から漏出したDNAを除去した。得られた細胞は、ポリ-L-リジンコート プレート(住友ベークライト)に 2.0×10^4 cells/cm²の密度で蒔く。培地に2mM L-グルタミン、0.1mg/mlゲンタマイシンを含む無血清培地 Neurobasal medium(Gibco BRL)に添加物B-27(Gibco BRL)を加えたものを用い、神経細胞を5% CO₂存在下、37℃で培養した。本活性化因子を神経細胞の培養開始時に添加して、適当日数培養した後に、下記するように細胞増殖と神経細胞のコリンアセチルトランスフェラーゼの活性を測定した。本活性化因子とともに、DNA合成阻害剤シトシンアラビノシドを添加した細胞群でも同様な測定をした。本活性化因子を添加すると細胞のコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)活性が増加し細胞の増殖が示され、本活性化因子と共にシトシンアラビノシドを添加すると増殖は阻害された(図4、図8)。

【0028】細胞増殖測定(MTT法)

材料

96穴プレートで培養した中隔野神経細胞の初代培養細胞、細胞増殖測定キット Cell Titer 96(Promega)、プレートリーダー SPECTRA MAX 250(Molecular Device)。

操作

摘出したラット胚・脳中隔野神経細胞を 2.0×10^4 cells/cm²の密度で96穴のポリ-L-リジンコートプレート(住友ベークライト)に蒔き、5% CO₂、37℃の条件で目的の日数培養した後に、細胞増殖を測定した。反応は、Promega社のCell Titer 96を用いて添付の手順書に従った。反応後にプレートリーダーSPECTRA MAX 250(Molecular Device)を用いて、670-630nmの差吸光度を測定した。差吸光度を、本活性化因子の添加有無の培養細胞で比較した。測定は各回毎に細胞培養の4穴ずつ行い、それらの平均値を求めた(図4、図5)。

【0029】コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)活性の測定(図8)

材料

24穴プレートで培養した中隔野神経細胞の初代培養細胞、PBS(-)、塩化ナトリウム(和光純薬)、Tris HCl X-100(ナカライテスク)、塩化コリン(Sigma)、ESERINE(フィソスチグミン硫酸塩:Sigma)、[1-¹⁴C] acetyl CoA(Amersham)、リン酸二水素カリウム(和光純薬)、テトラフェニルホウ酸ナトリウム(ナカライテスク)、液体クロマトグラフィー用アセトニトリル(和光純薬)、液体シンチレーション用トルエン(ナカライテスク)、シンチレーションカウンター(BECKMAN)

N)、抗NGF中和抗体(Boehringer Mannheim)、シトシンアラビノシド(Sigma)。

【0030】操作

実施例2に記載の方法で摘出したラット胚中隔野神経細胞を24穴ポリ-L-リジンコートプレートで目的の日数培養し、プレートの培地を24G注射針を付けたアスピレーターで吸引除去した。各穴に細胞可溶化液(1M NaCl、2.5g TritonX-100)10ulと反応溶液(50mM PB-K pH6.8、0.2M NaCl、8mM塩化コリン、1mM EDTA、0.1mMエゼリン、0.5% TritonX-100、25uM [1-¹⁴C] acetyl CoA (2-10 mCi/mmol) 100ulを添加して37℃、30分インキュベートした。反応停止液(50M PB-K pH6.5、1mM EDTA) 250ulを加えて酵素反応を停止した。反応液360ulをカリグノスト液(0.5%テトラフェニルホウ酸ナトリウム/アセトニトリル溶液) 1ml及び液体シンチレーション用トルエン2mlを分注した試験管に加えた。ボルテックスミキサーで1分間攪拌混和し、抽出した。5000rpmで1分間遠心分離し、上層の有機溶媒層1ml採取して、シンチレーターULTIMA GOLD (パッカードジャパン) 1mlを分注したオムニバイアルに加えて混和した。オムニバイアルをラックに並べ、シンチレーションカウンターで[1-¹⁴C]アセチルコリンの放射活性を測定した。本活性化因子を添加した神経培養細胞と非添加の神経培養細胞のChAT活性を測定した。また、本活性化因子と同時に抗NGF中和抗体(Boehringer Mannheim)またはシトシンアラビノシド(Sigma)を添加した神経培養細胞で測定し、本活性化因子のみを添加した神経培養細胞と比較した(図8、図9)。

【0031】実施例5 神経の特異的蛋白質抗体による免疫染色

材料

胎生17日目ラット胚・中隔野神経細胞の初代培養細胞、Anti-Neurofilament 160kDa (Boehringer Mannheim)、Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (Boehringer Mannheim)、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG (Promega)、PBS (-) (ニッスイ)、ウシ血清アルブミン (Sigma)、発色基質溶液NBT-BCIP stable mix (Gibco BRL)、メタノール (和光純薬)、ポリ-D-リジンコートカバースリップ (BIO COAT CELLWARE, Collaborative Biomedical Products)。

【0032】操作

実施例4に記載の様に摘出したラット胚中隔野神経細胞を12穴プレートにおいて、ポリ-D-リジンコートカバースリップ上に培養した。培養細胞液から培地を除き、PBS (-) で細胞を濯ぐ。予め-20℃で冷却したメタノールを加え、細胞を固定する。カバースリップを新しい12穴プレートへ移し、0.1% BSA/PBS (-) を静かに加え、3分間静置した。さらに、0.1% BSA/PBS (-) 1mlの新しいウエルにカバースリップを移し、これを3回繰り返した。最後に、カバースリップをウエルより取り出し、縁をキムワイプで拭いてPBS (-) を取り除く。モイスチャンパー(チップケース)にカバースリップを移し、1次抗体(Anti-Neuro-filament 160kDaまたはAnti-GFAP)を添加した。30分室温に静置した。カバースリップを0.1% BSA/PBS (-) 1mlで3回洗浄した。最後に、キムワイプで縁を拭いて、モイスチャンパーにカバースリップを移し、2次抗体(アルカリフォスファターゼ標識anti-マウスIgG抗体)を添加した。30分室温に静置する。カバースリップを0.1% BSA/PBS (-) 1mlで3回洗浄し、最後にキムワイプで拭いた後に、発色基質溶液NBT-BCIP stable mixを添加した。15分間室温に静置した後に、位相差顕微鏡で発色を確認後に、PBS (-) を分注した新しいウエルに移し観察した。増殖した細胞の約半分が染色されアストロサイトであることを示し、染色されない細胞はその形態からO-2A幹細胞であることを示した。

【0033】

【発明の効果】本発明によれば、ヒト尿由来の新規なグリア細胞増殖因子が単離され、その分子量及びN末端アミノ酸配列等の知見が提供され、同因子の量産への途が開かれた。同因子はグリア細胞のNGF因子分泌を促進させ、ChAT活性を増大させる作用を示すので種々の神経系疾患の治療に応用されうる。

【図面の簡単な説明】

【図1】陰イオン交換樹脂HPA25非吸着画分を硫酸分画した試料をSuperdex 200 column上でゲルろ過したときの本活性化因子分画フラクションの溶出パターン。

Superdex 200pg XK26/60 (320ml)

緩衝液: PBS (-)

流速: 2ml/min

分画量: 4ml

本活性化因子は溶出開始から0.75C.V.-0.94C.V.の灰色分画に溶出。

【図2】RP-HPLC上での本活性化因子のクロマトグラム。

カラム: C18、vydac218TP54

溶出液A: 0.1% TFA in milli-Q
溶出液B: 0.1% TFA in 70%アセトニトリル

流速 : 1.0 ml/min

勾配 : 破線

検出 : UV 214 nm

【図3】本活性因子のSDS-PAGE電気泳動分析の写真。

レーン1: 分子量マーカー (Bio-Rad)

レーン2: 非還元、銀染色

レーン3: 還元、銀染色

レーン4: 分子量マーカー

レーン5: 非還元、CBB染色

レーン6: 還元、CBB染色

【図4】ラット胚・脳中隔野神経細胞を各添加物存在下で7日間培養後の細胞の写真。

上) 本活性化因子を添加した細胞

中) 本活性化因子と1 μ Mのシトシンアラビノシドを添加した細胞

下) 無添加の細胞

【図5】ラット胚・脳中隔野神経細胞を本活性因子の添加および無添加の下に培養して細胞数の変化をMTT法により測定したグラフ。初代培養細胞を 2×10^4 cells/cm²の密度で蒔き、無血清培地Neurobasal medium下、培養日数に従い測定した。

(●): 本活性因子添加 (0.001 O. D. units/ml)

(▲): 本活性因子無添加

【図6】本活性因子のN-末端アミノ酸配列。1位がTyr。

【図7】本活性因子のN-末端アミノ酸配列。1位がSer。

【図8】神経細胞を血清除去の培地で、種々の項目の条件で培養したときのアセチルコリントランスフェラーゼ (ChAT) 活性の経時変化を示すグラフ。

(●): 本活性因子添加 (0.001 O. D. units/ml)、

(○): 本活性因子無添加、

(▲): 本活性因子添加 (0.001 O. D. units/ml) とシトシンアラビノシド (1 μ M) 添加

(◆): シトシンアラビノシド (1 μ M) 添加

【図9】抗NGF中和抗体による神経栄養因子効果の阻害を示す棒グラフ。細胞を血清除去の培地に本活性因子 (0.001 O. D. units/ml) と抗NGF中和抗体を (0、10、100、1000 ng/ml) を加えて8日間培養し、ChAT活性を測定した。データはChATにより生成した¹⁴C-acetylcholineの放射活性値CPMで表した3検体の平均値を測定値とした。

【図6】

1 5 10
Tyr-Gly-Gly-Gly-Phe-Trp-Asp-Asn-Gly-His-Leu-Tyr-
15 20
Arg-Glu-Asp-Gln-Thr-Ser-Pro-Ala-Pro-Gly-Leu-Arg-
25 30 35
Xaa-Leu-Asn-Trp-Xaa-Asp-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Ala-
39
Ser-Ala-Pro

【図7】

1 5 10
Ser-Gly-Gly-Gly-Phe-Trp-Asp-Asn-Gly-His-Leu-Tyr-
15 20
Arg-Glu-Asp-Gln-Thr-Ser-Pro-Ala-Pro-Gly-Leu-Arg-
25 30 35
Xaa-Leu-Asn-Trp-Xaa-Asp-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Ala-
39
Ser-Ala-Pro

【図1】

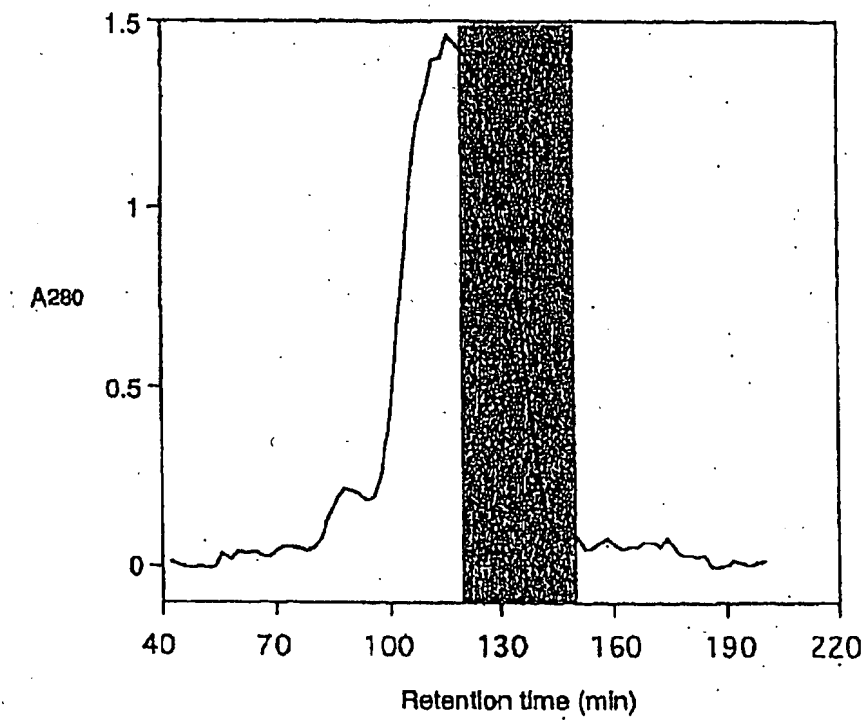


図1. Superdex 200 column上でのHPA25本活性因子分画フラクションの溶出パターン

【図2】

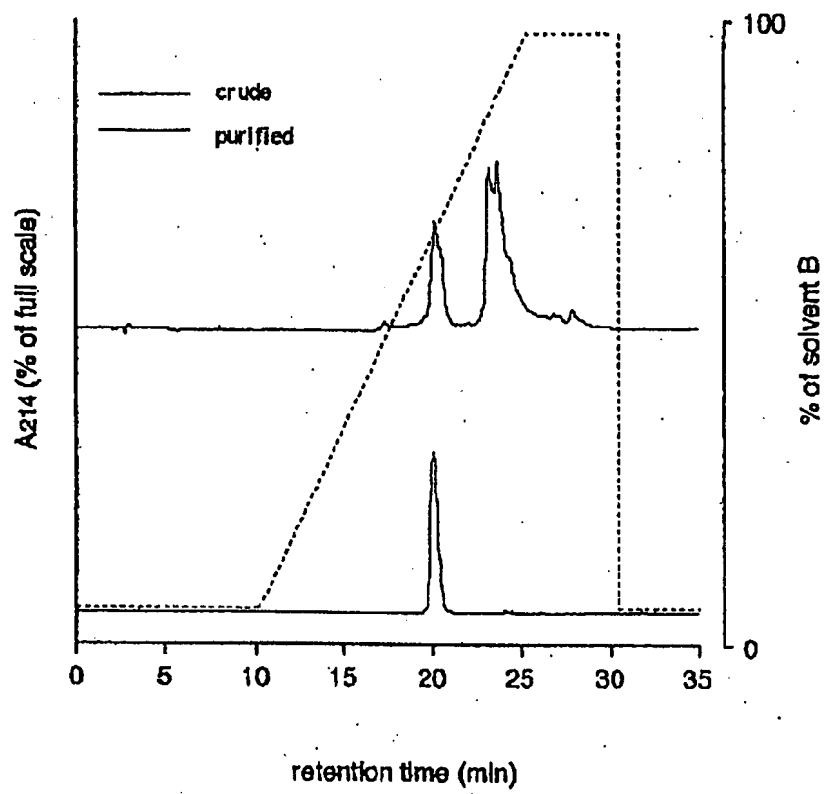


図 2. RP-HPLC上での本活性因子のクロマトグラム

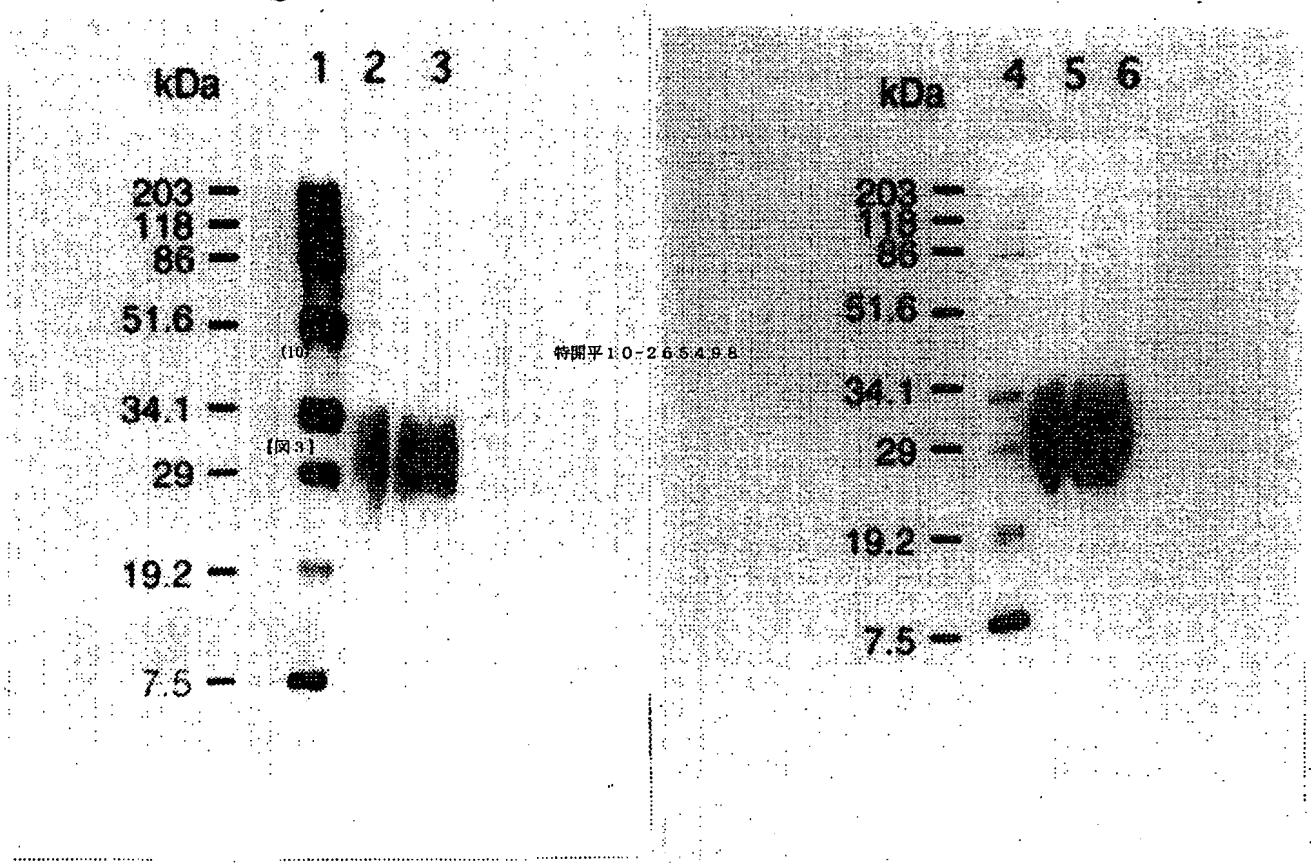


図 3. 本活性因子の SDS-PAGE 電気泳動分析

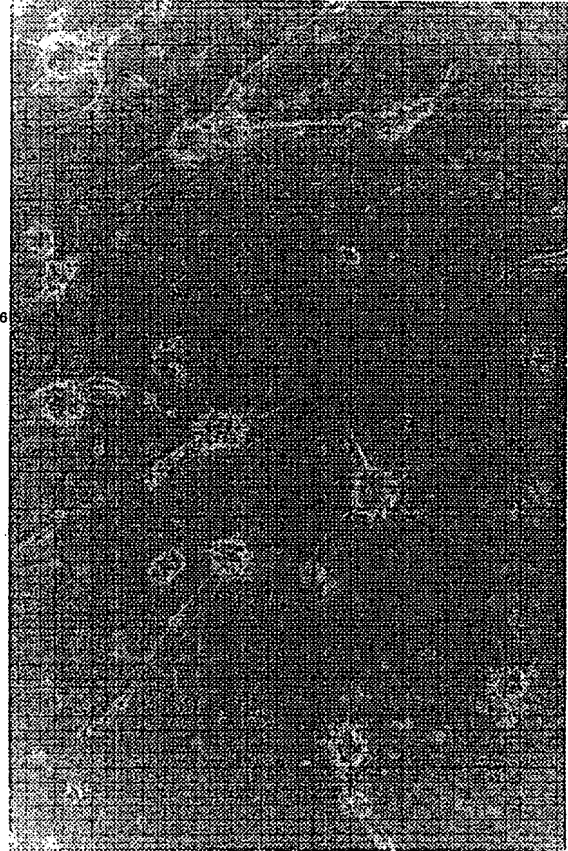


図 4.

ラット胚-脳中隔野神経細胞の増殖、
各添加物存在下で7日間培養後の細胞。

上) 本活性化因子を添加した細胞

中) 本活性化因子と1 μ Mのcytosine
arabiosideを添加した細胞

下) 無添加の細胞

【図5】

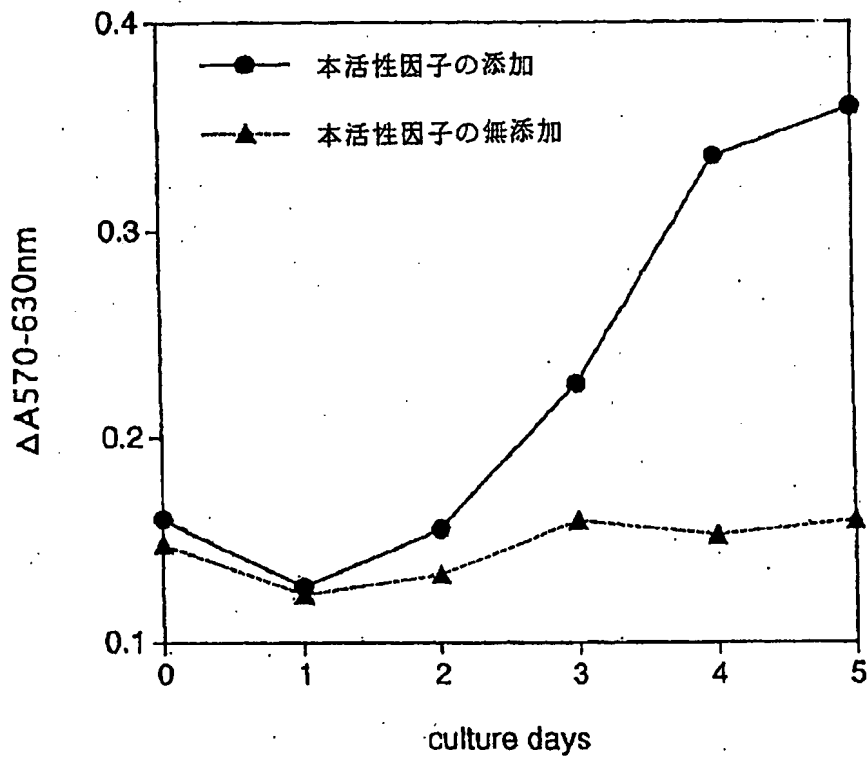


図5. 本活性因子の添加及び無添加条件下での細胞数の経時変化(MTT分析)

【図8】

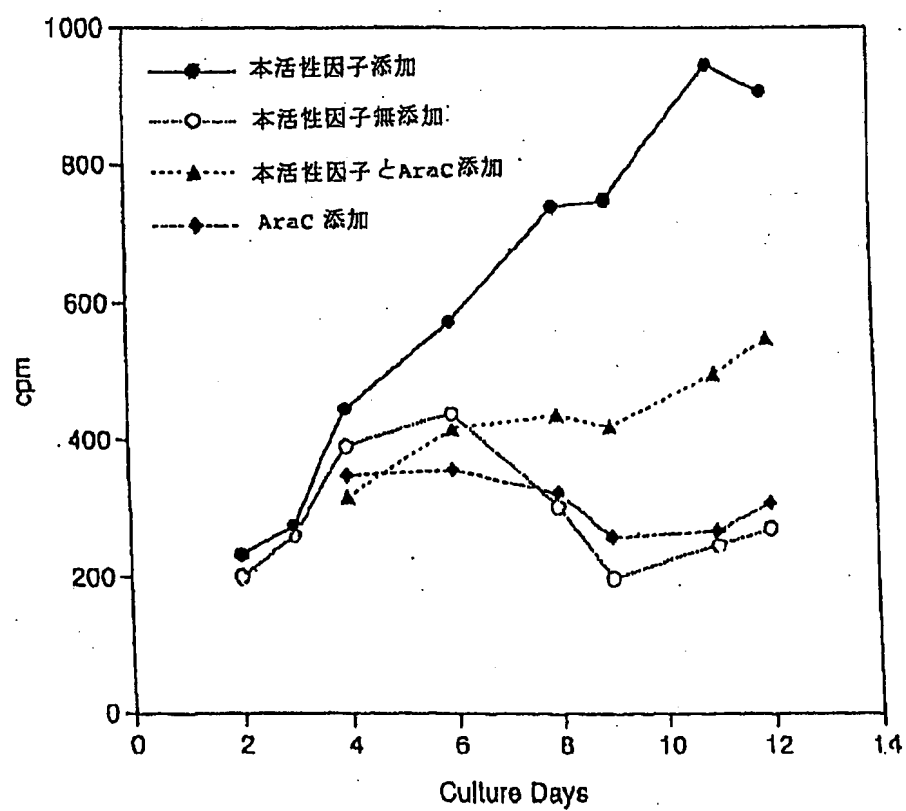


図 8. 神経細胞のアセチルコリントランスフェラーゼ(ChAT)活性の経時変化

【図9】

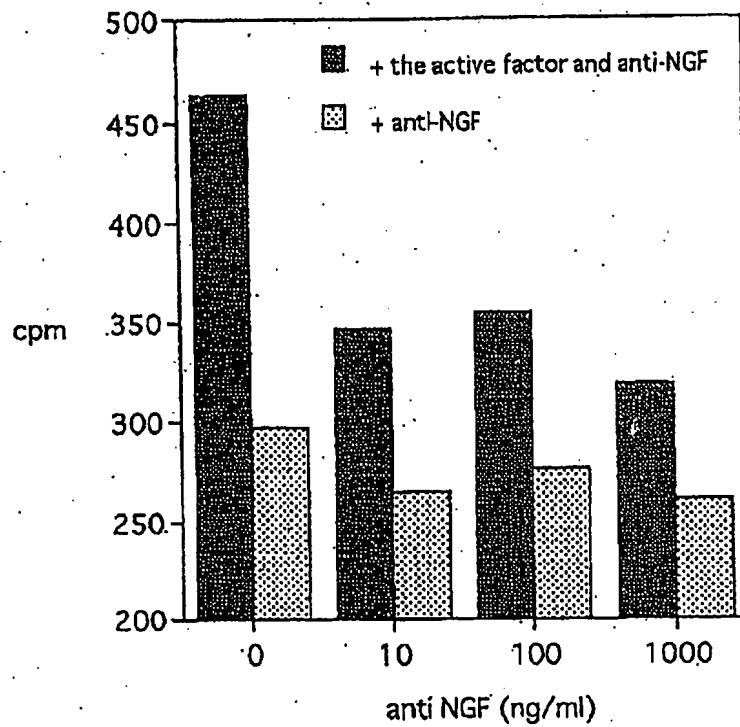


図9 抗NGF中和抗体による神経栄養因子効果の阻害

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 37/02	AAA
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A

(72) 発明者 古賀 淳一
神戸市西区狩場台1-30-5